

EFFET DE LA LUMIÈRE SUR L'ACCUMULATION DE LIPIDES NEUTRES ET LA COMPOSITION DE LA BIOMASSE CHEZ L'ALGUE *BOTRYOCOCCUS SUDETICUS* (CHLOROPHYCEAE)

Rafael VAZQUEZ-DUHALT

Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California
Sur. Apartado Postal 128, La Paz, Baja California Sur,
23000 México.

RÉSUMÉ - La production de biomasse et la composition cellulaire de la microalgue verte *Botryococcus sudeticus* Lemmermann ont été déterminées dans des cultures soumises à différentes intensités et temps d'éclairement. Les productions de biomasse, hydrates de carbone et lipides neutres ont été stimulées par l'augmentation soit de l'intensité lumineuse, soit du temps d'éclairement. Les lipides neutres, spécifiquement les triglycérides, sont la principale réserve nutritive et énergétique des cellules chez *B. sudeticus*. Cette souche peut accumuler des triglycérides à plus de 20% de sa biomasse sèche.

ABSTRACT - The biomass production and the cell composition of *Botryococcus sudeticus* Lemmermann a green microalga, have been determined in cultures under different light intensities and light-dark cycles. The production of biomass, carbohydrates and neutral lipids have been increased by, both, the light intensity and light-phase time. The neutral lipids, mainly triglycerides, are the most important energy and food reserve. This strain is able to accumulate triglycerides up to 20% of its dry weight.

MOTS CLÉS : Chlorophyceae, *Botryococcus sudeticus* Lemmermann, lipides neutres, effet de la lumière, composition cellulaire.

INTRODUCTION

La production et l'accumulation des lipides chez le phytoplancton sont régulées par divers facteurs. Différents paramètres ont été étudiés, tels que la concentration d'azote et de silice, la température, la salinité, etc. (Aaronsen, 1973; Shifrin & Chisholm, 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1985; Vazquez-Duhalt & Arredondo-Vega, 1990).

La lumière peut, elle aussi, affecter fortement le métabolisme des cellules photosynthétiques. De l'effet de l'intensité lumineuse sur la vitesse spécifique de croissance sont définies les intensités lumineuses de saturation et de photoinhibition. L'effet de l'intensité d'éclairement sur l'accumulation des

lipides, chez les microalgues varie suivant les différentes espèces (Thompson *et al.*, 1990).

Botryococcus sudeticus Lemmermann a été récemment étudié et les cinétiques de production des constituants cellulaires, ainsi que la composition des lipides ont été déterminées (Vazquez-Duhalt & Greppin, 1987a). Cette algue est capable d'accumuler des lipides neutres, principalement des triglycérides, lesquels contiennent une haute proportion d'acide oléique. La composition de l'huile produite par *B. sudeticus* ressemble à celle de l'huile d'olive, donc son utilisation comme huile alimentaire a été proposée (Vazquez-Duhalt & Greppin, 1987b).

Le but de ce travail est de déterminer l'effet de la lumière sur l'accumulation des lipides neutres et des autres constituants cellulaires chez *B. sudeticus*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cellules de *Botryococcus braunii* Kützing ont été isolées de la souche de *B. braunii* de la collection de Cambridge (LB 807/1) de la façon suivante: la culture de la collection de Cambridge a été mise en culture pendant 4 semaines; ensuite les cellules ont été filtrées sur un filtre à 5 µm et lavées avec un litre de milieu sous des conditions stériles; les cellules lavées ont été dispersées dans des boîtes de Petri contenant le milieu agarisé avec 0.2% de glucose, où les colonies non productrices d'hydrocarbures et libres de bactéries ont pu être obtenues.

Les conditions de culture et les méthodes d'extraction, de séparation et d'analyse des lipides ont été décrites dans des travaux antérieurs (Vazquez-Duhalt, 1987a).

Les lipides neutres ont été fractionnés par chromatographie sur couche mince préparative. L'application de l'échantillon de lipides (50-100mg) a été réalisée tout le long de plaques en verre recouvertes de 1 ou 1,5mm de gel de silice 60. Après la migration du front du solvant (éther de pétrole 40-60°C-diéthyléther-acide acétique, 90:10:1), les plaques ont été séchées et la bande des triglycérides (R_f 0,4-0,7) collectée et désabsorbée avec du diéthyléther par centrifugations successives. La solution ainsi obtenue a été évaporée sous vide et utilisée pour la détermination quantitative. Les liaisons esters dans les triglycérides ont été quantifiées par complexation avec l'hydroxylamine alcaline et coloration avec le perchlorate de fer, d'après la méthode de Renkonen (1961). La densité optique a été calibrée avec différentes concentrations de méthyl esters d'acides gras.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'examen au microscope des colonies non productrices d'hydrocarbures issues de la souche de *B. braunii* de la collection de Cambridge (Figure 1) a montré les caractéristiques suivantes: cellules sphériques avec un diamètre de

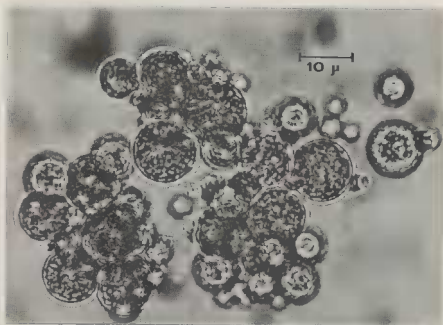


Figure 1: Colonies de *Botryococcus sudeticus*.

10 à 17 μm enfermées et supportées dans une enveloppe mucilagineuse incolore. Les cellules organisent des colonies de forme irrégulière, contenant un nombre de cellules très variable.

La reproduction se fait asexuellement au moyen d'autospores et la paroi de la cellule mère rejetée a une forme de nacelle dimidiée (divisée en deux) (Figure 2 à 6). Les cellules accumulent une huile et les chloroplastes forment un réseau pariétal (Figure 7). Toutes ces caractéristiques morphologiques indiquent que cette algue appartient à la famille des *Botryococcaceae* et à l'espèce *Botryococcus sudeticus*. *B. sudeticus* a été décrit par Lemmermann (1896) et il a été souvent confondu avec *B. braunii* (Bourrelly, 1966). En 1922 *B. sudeticus* a été ré-examiné (Chodat, 1922) et a été nommé *Botryosphaera sudetica* afin de le distinguer vis-à-vis de *Botryococcus* Kützing.

La présence de *B. sudeticus* dans les cultures de *B. braunii* de la collection de Cambridge peut expliquer les faibles productions d'hydrocarbures trouvées dans quelques travaux avec cette souche (Gelpi *et al.*, 1968, 1970; Murray & Thompson, 1977; Chirac *et al.*, 1983). Finalement, il semble possible que les cellules décrites comme un état physiologique de *B. braunii* (large spherical green cells) produisant très peu d'hydrocarbures (Brown *et al.*, 1969) et les cellules sphériques étroitement associées avec le mucilage des colonies de *B. braunii* isolées d'un lac d'Australie (Metzger *et al.*, 1985) soient en réalité des algues appartenant à l'espèce *Botryococcus sudeticus*.

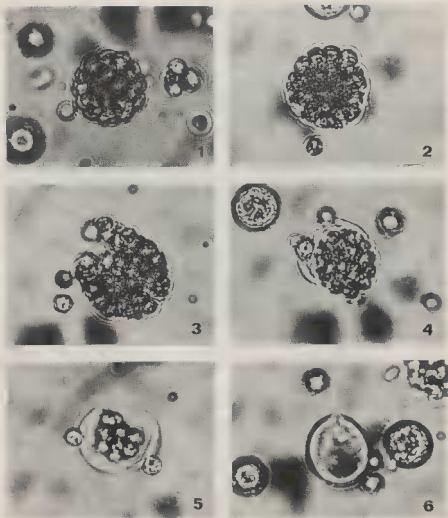


Figure 2 à 6: Séquence de la formation d'autospores chez *Botryococcus sudeticus*.

Une série d'expériences a été réalisée pour déterminer l'effet de l'intensité lumineuse sur les cultures de *B. sudeticus* et les résultats obtenus peuvent être observés dans le Tableau 1. La croissance après 5 semaines de culture a une valeur maximale à $12841 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{sec}^{-1}$, tandis qu'à $6420 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ cette croissance (biomasse sèche) ne présente que deux tiers de la valeur maximale.

Les cultures hétérotrophes dans un milieu minéral contenant une source carbonée (glucose) ne peuvent pas être obtenues sans l'addition d'un extrait extracellulaire issu de cultures photoautotrophes. Ceci s'explique par la

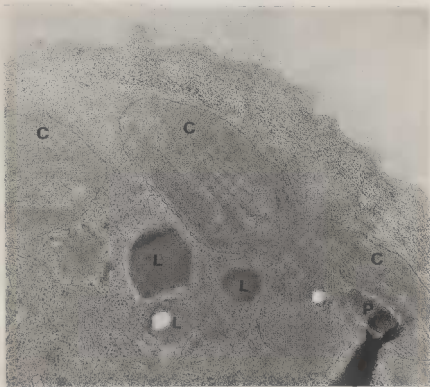


Figure 7: Photographie au microscope électronique de *Botryococcus sudeticus*. (C) chloroplastes; (L) corps huileux; (P) pyrénoides.

présence d'une ou plusieurs substances ayant la fonction de facteurs de croissance dans le milieu après la culture. Il semblerait que ces substances soient produites et sécrétées par les cellules seulement en présence de la lumière. L'une des caractéristiques de ces facteurs de croissance est leur thermostabilité (ils restent actifs même après l'autoclavage).

Chez tous les organismes photosynthétiques la vitesse initiale de photosynthèse augmente de façon proportionnelle avec l'intensité lumineuse à faibles intensités d'éclairement. Cette relation est décrite par une courbe asymptotique à éclairement saturant (Miller & Kamykowski, 1986). Il semble que ce comportement à intensités saturantes soit provoqué plutôt par la fixation de carbone que par le transport d'électrons (Sukeník *et al.*, 1987). Le même type de relation intervient entre l'intensité lumineuse et la croissance (Sukeník *et al.*, 1989; Thompson *et al.*, 1990). Il semble, donc, que dans le cas de *B. sudeticus* les cultures se trouvent sous saturation de lumière à $12841 \text{ ergs.cm}^{-2}.\text{sec}^{-1}$.

Tableau I. - Effet de l'intensité lumineuse sur la production de biomasse et la composition cellulaire de *Botryococcus sudeticus* après 5 semaines de culture (16 hrs de lumière par jour).

	Intensité lumineuse ($\text{ergs}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$)			
	0	6476	12841	19260
Poids sec (mg/l)	636 (± 53)	790 (± 26)	1203 (± 165)	1023 (± 134)
Protéines (% p.s.)	13,26 ($\pm 2,05$)	11,39 ($\pm 0,76$)	8,48 ($\pm 1,00$)	6,22 ($\pm 0,78$)
Hydrates de carbone (% p.s.)	7,78 ($\pm 1,90$)	13,17 ($\pm 2,28$)	8,14 ($\pm 0,66$)	9,91 ($\pm 1,27$)
Lipides neutres (% p.s.)	3,01 ($\pm 0,48$)	11,92 ($\pm 0,02$)	14,65 ($\pm 1,50$)	15,44 ($\pm 1,95$)
Triglycérides (% p.s.)	1,60 ($\pm 0,26$)	9,58 ($\pm 0,12$)	12,03 ($\pm 1,23$)	12,62 ($\pm 1,59$)
Chlorophylles (mg/g p.s.)	0,00 ($\pm 0,00$)	21,00 ($\pm 3,32$)	10,97 ($\pm 1,92$)	10,00 ($\pm 0,58$)
Chl. a / Chl. b	-	1,47	1,12	1,85
Caroténoïdes (mg/g p.s.)	0,295 ($\pm 0,056$)	0,865 ($\pm 0,150$)	0,532 ($\pm 0,051$)	0,512 ($\pm 0,071$)

Les chiffres entre parenthèses indiquent l'écart-type de 5 expériences indépendantes. p.s. = poids sec.

La composition des cellules de *B. sudeticus* change avec l'intensité lumineuse (Tableau I). Les effets les plus importants sont une diminution proportionnelle de la teneur en protéine et une augmentation, aussi corrélative, des lipides neutres. L'augmentation de la teneur cellulaire en lipides neutres est surtout due à l'accumulation des triglycérides, lesquels ont augmenté de 1,6% de la biomasse sèche dans les cultures sous obscurité à plus de 12,6% dans les cultures sous 19260 $\text{ergs}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$. Par contre, les autres lipides neutres ont varié seulement de 1,41% à 2,82% de la biomasse sèche.

Chez d'autres espèces de microalgues la teneur en protéines peut être soit augmentée (Ben-Amotz, 1987; Thompson *et al.*, 1990), soit diminuée (Thompson *et al.*, 1990) ou non changée (Sukenic *et al.*, 1989). En ce qui concerne les lipides neutres il existe peu d'information sur l'effet de la lumière, mais chez *B. sudeticus* l'accumulation de lipides est principalement sous forme de triglycérides, comme dans les cas de *Nitzschia closterium* (Ehr.) W. Smith (Orcutt & Patterson, 1974) et *Nannochloropsis* sp. (Sukenic *et al.*, 1989).

La production de chlorophylles chez *B. sudeticus* diminue de façon inverse et proportionnelle à l'intensité d'éclairement. L'effet est presque linéaire pour la chlorophylle totale. Les cultures hétérotrophes produisent des cellules étioilées, dépourvues de pigments verts. Cette diminution de la teneur en chlorophylles selon l'intensité d'éclairement a été aussi détectée chez plusieurs espèces d'algues (Constantopoulos & Bloch, 1967; Ben-Amotz, 1987; Sukenic *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1990). Il est bien connu que le volume des chloroplastes diminue si l'intensité de la lumière augmente.

Chez *B. sudeticus*, comme dans le cas des autres algues (Spurgeon & Porter, 1980), la biosynthèse des caroténoïdes est indépendante de l'intensité

lumineuse, mais leur accumulation peut être fortement influencée par l'intensité lumineuse comme dans le cas de quelques espèces telles que *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz et Avron (Ben-Amotz, 1987).

Il y a un autre paramètre concernant l'éclairage des cultures qui est celui du cycle lumière-obscurité. Les résultats de l'effet de la durée de la phase lumineuse sur la composition cellulaire sont montrés dans le tableau II. La production de biomasse, les teneurs en hydrates de carbone, lipides neutres et triglycérides augmentent proportionnellement avec le temps d'éclairage, tandis que la teneur en protéines diminue. Il faut indiquer que l'augmentation de la teneur en hydrates de carbone lorsqu'on augmente la durée d'éclairage est faible comparée aux variations observées pour les autres groupes de constituants.

Il n'existe pas dans la littérature d'informations concernant la relation entre la durée de la phase lumineuse et la composition cellulaire chez les algues. Par contre, dans des cultures effectuées avec un cycle lumière-obscurité, il est bien connu que la division cellulaire est réalisée durant la phase obscure et que les teneurs en protéines, hydrates de carbone et surtout lipides sont augmentées durant la phase lumineuse (Shifrin & Chisholm, 1981; Sukenik & Carmeli, 1990). Ces changements sont aussi détectables au niveau morphologique où le volume relatif des lipides dans la cellule augmente fortement pendant la phase lumineuse pour diminuer ensuite rapidement dans la phase obscure (Sicko-Goad *et al.*, 1988).

Tableau III - Effet de la durée de la phase lumineuse dans le cycle lumière-obscurité sur la production et la composition cellulaire des cultures de *Botryococcus sudeticus* après 5 semaines de cultures.

	Eclairage journalier (heures) ^a		
	0	16	24
Poids sec (mg/l)	636 (±53)	1042 (±80)	1589 (±178)
Protéines (% p.s.)	13,26 (±2,05)	7,03 (±0,77)	6,50 (±0,50)
Hydrates de carbone (% p.s.)	7,78 (±1,90)	8,18 (±1,64)	8,34 (±2,45)
Lipides neutres (% p.s.)	3,01 (±0,48)	13,49 (±0,96)	15,20 (±1,07)
Triglycérides (% p.s.)	1,60 (±0,26)	10,98 (±0,78)	12,45 (±0,88)
Chlorophylles (mg/g p.s.)	0,00 (±0,00)	8,80 (±0,29)	9,32 (±0,13)
Chl.a / Chl.b	—	1,16	1,16
Caroténoïdes (mg/g p.s.)	0,295 (±0,056)	0,412 (±0,071)	0,386 (±0,042)

Les chiffres entre parenthèses indiquent l'écart-type de 5 expériences indépendantes. p.s. = poids sec.

^a L'intensité lumineuse dans la phase lumière a été de 19260 erg.cm⁻². sec⁻¹.

Chez *B. sudeticus*, les pigments ne sont pas affectés significativement par la durée de la phase lumineuse (Tableau II).

Dans les expériences antérieures, l'un des effets de la lumière a été le ralentissement ou l'accélération de divisions cellulaires. En vue d'éviter ce phénomène et de déterminer l'effet du transfert des cultures, soit à l'obscurité totale soit à la lumière continue, une série d'expériences a été réalisée en transférant des cultures dans la phase stationnaire de croissance sous ces deux conditions. C'est-à-dire que les cultures, après 5 semaines sous alternance lumière-obscurité, sont transférées en lumière continue ou à l'obscurité totale. Les cultures ont été analysées après 5, 6 et 7 semaines de culture, soit après 0, 1 et 2 semaines de traitement.

Dans la figure 8 sont montrés les résultats de l'évolution de la composition de la biomasse. On peut noter qu'à la lumière continue la biomasse sèche reste la même que dans le témoin, qui a toujours été soumis à l'alternance lumière-obscurité. Par contre, les cultures à l'obscurité totale perdent environ 30% de leur poids sec pendant la première semaine. Cette diminution peut être facilement expliquée par l'utilisation des réserves nutritives quand les cellules n'ont plus la possibilité de faire la photosynthèse. En effet, bien que les protéines restent identiques au témoin, les hydrates de carbone diminuent fortement de même que la quantité de lipides neutres. Dès 292mg de biomasse sèche perdue en moyenne pendant la première semaine dans un litre de culture, 52,5mg sont dus aux lipides neutres et 35,5mg aux hydrates de carbone. Ceci montre que les lipides neutres comme les hydrates de carbone servent en

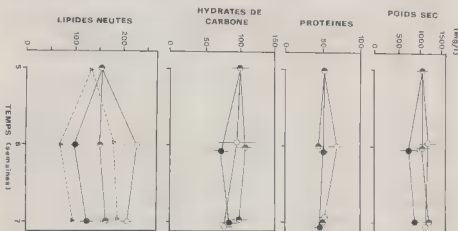


Figure 8: Evolutions des quantités de biomasse sèche, protéines, hydrates de carbone et lipides neutres dans les cultures (agées de 5 semaines) après le transfert sous lumière continue (o) et sous obscurité totale (●). Le contrôle (●) a toujours été soumis à 16 heures de lumière par jour ($19260 \text{ erg.cm}^{-2}\text{.sec}^{-1}$). Les lignes pointillées représentent la teneur en triglycérides. Les écart-types ont été calculés à partir de 4 expériences indépendantes.

tant que réserves énergétiques chez *B. sudeticus*. Dans le cas des lipides, les triglycérides ont été le plus métabolisés par les cellules à l'obscurité. Eux seuls ont enregistré une perte de 86mg.l⁻¹ pendant la première semaine et par conséquent leur proportion a diminué de 82% à 72% des lipides neutres.

Les cultures transférées à la lumière continue, comme il a été dit auparavant, présentent les mêmes valeurs de poids sec que celles du contrôle; toutefois les protéines, après avoir augmenté pendant la première semaine, regagnent les valeurs du contrôle dès la deuxième semaine. Les hydrates de carbone diminuent légèrement mais progressivement; par contre les lipides neutres augmentent d'une façon très importante pendant la première semaine (Figure 4). Les lipides neutres passent d'environ 15% de la biomasse sèche à environ 20%, et cette augmentation est principalement due à la synthèse des triglycérides lesquels passent de 81% à 90% des lipides neutres pendant deux semaines de traitement. C'est-à-dire que les triglycérides augmentent de 12,32% à 17,26% du poids sec des cellules, tandis que les autres lipides neutres diminuent de 2,75% à 1.80% de la biomasse sèche.

CONCLUSIONS

Des résultats antérieurs, on peut retenir les observations suivantes: *Botryococcus sudeticus* a pu être isolé de la souche de *B. braunii* de la collection de Cambridge. La croissance de *B. sudeticus* et sa composition cellulaire sont affectées par l'intensité lumineuse et par le temps d'éclairement dans le cycle journalier. *B. sudeticus* est capable de croître sous conditions hétérotrophes dès que des facteurs de croissance sont présents. La teneur en protéines varie de façon inverse à l'intensité et au temps d'éclairement. En ce qui concerne les lipides neutres, la teneur est augmentée par l'intensité et par la durée de la phase lumineuse. Ces augmentations sont principalement dues à l'accumulation de triglycérides dans les cellules. Finalement, les triglycérides produits par *Botryococcus sudeticus* sont les plus importantes réserves nutritives et énergétiques des cellules.

RÉFÉRENCES

- AARONSON S., 1973 - Effects of incubation temperature on the macromolecular and lipids content on the dinoflagellate *Ochromonas danica*. *J. Phycol.* 25: 686-692.
- BEN-AMOTZ A., TORNABENE T.G. & THOMAS W.H., 1985 - Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- BEN-AMOTZ A., 1987 - Effect of irradiance and deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta). *Plant Physiol.* 131: 479-487.
- BOURRELLY P., 1966 - Les algues d'eau douce. Vol. 1, les algues vertes. Editions N. Boubée et Cie. Paris.
- BROWN A.C., KNIGHTS B.A. & CONWAY E., 1969 - Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 8: 543-547.

- CHIRAC C., CASADEVALL E. & LARGEAU C., 1983 - Croissance et production d'hydrocarbures de l'algue *Botryococcus braunii* en cultures associées. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris*, sér. 3, 297: 187-190.
- CHODAT R., 1922 - Histoire des algues de la Suisse. *Bull. Soc. Bot. Genève* 2ème série 12: 66-144.
- CONSTANTOPOULOS G. & BLOCH K., 1967 - Effect of light intensity on the lipid composition of *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 242: 3538-3542.
- GELPI E., ORO J., SCHNEIDER M.J. & BENNETT E.O., 1968 - Oleofins of high molecular weight in two microscopic algae. *Science* 161: 700-702.
- GELPI E., SCHNEIDER H., MANN J. & ORO J., 1970 - Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic microalgae. *Phytochemistry* 9: 602-603.
- LEMMERMANN E., 1896 - Zur Algenflora des Riesengebirges. *Forsch. Biol. Stat. Z. Plin* 4: 88-133.
- METZGER P., BERKALOFF C., CASADEVALL E. & COUTÉ A., 1985 - Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strain of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 24: 2305-2312.
- MILLER R.L. & KAMYKOWSKI D.L., 1986 - Effect of temperature, salinity, irradiation and diurnal periodicity on growth and photosynthesis in the diatom *Nitzschia americana*: light-saturated growth. *J. Phycol.* 22: 339-348.
- MURRAY J. & THOMPSON A., 1977 - Hydrocarbon production in *Anacystis montana* and *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 16: 465-468.
- ORCUTT D.M. & PATERSON G.W., 1974 - Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*). *Lipids* 9: 1000-1003.
- RENKONEN O., 1961 - A note on spectrophotometric determination of aryl ester groups in lipids. *Biochem. Biophys. Acta.* 54: 361-362.
- SHIFRIN N.S. & CHISHOLM S.W., 1981 - Phytoplankton lipids: Interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17: 374-384.
- SICKO-GOAD L., SIMMONS M.S., LAZINSKY D. & HALL J., 1988 - Effect of light cycle on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. *J. Phycol.* 24: 1-7.
- SPURGEON S.L. & PORTER J.W., 1980 - Carotenoids. *In The Biochemical of Plants*. Academic Press, Vol. 4, pp. 419-483.
- SUKENIK A., BENNETT J. & FALKOWSKI P., 1987 - Light-saturated photosynthesis-limitation by electron transport or carbon fixation? *Biochim. Biophys. Acta.* 891: 205-215.
- SUKENIK A., CARMELI Y. & BERNER T., 1989 - Regulation of fatty acid composition by growth irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686-692.
- SUKENIK A. & CARMELI Y., 1990 - Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) growth in a light-dark cycle. *J. Phycol.* 26: 463-469.
- THOMPSON P.A., HAPRISON P.J. & WHYTE J.N.C., 1990 - Influence of irradiation on the fatty acid composition of phytoplankton. *J. Phycol.* 26: 278-288.
- VAZQUEZ-DUHALT R. & GREPPIN H., 1987a - Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry* 26: 885-889.

- VAZQUEZ-DUHALT R. & GREPPIN H., 1987b - *Botryococcus sudeticus* Lemm., une algue productrice d'huile alimentaire. *Saussurea* 18: 55-63.
- VAZQUEZ-DUHALT R. & ARREDONDO-VEGA B.O., 1990 - Oil production from microalgae under saline stress. In GRASSI G., GOSSE G. & DOS SANTOS G. (Eds.), *Biomass for Energy and Industry*. Elsevier Applied Science, London. Vol. 1, pp. 547-551.